UNIVERSITÉ PARIS-SUD

FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

64

ANNÉE 1972

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Jean-Louis VIRELIZIER

né le 10 mars 1940 à Rabat (Maroc)

Interne des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le octobre 1972

ÉTUDE VIROLOGIQUE ET IMMUNOLOGIQUE D'UNE VIROSE PERSISTANTE CHEZ LA SOURIS INFECTÉE PAR LE VIRUS DE L'HÉPATITE MURINE (M.H.V. 3)

Président du Jury de Thèse : M. D. ALAGILLE

UNIVERSITE PARIS-SUD - FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

VIRELIZIER Jean-Louis

Interne des Hôpitaux de Paris,

Né le 10 mars 1940 à Rabat (Maroc)

Présentée et soutenue publiquement le octobre 1972.

ETUDE VIROLOGIQUE ET IMMUNOLOGIQUE D'UNE VIROSE PERSISTANTE CHEZ LA SOURIS INFECTEE PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE MURINE (H. B. V. 3)

Président de Thèse : M. D. ALAGILLE

UNIVERSITE PARIS-SUD - FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

VIRELIZIER Jean-Louis

Interne des Hôpitaux de Paris,

né le 10 mars 1940 à Rabat (Maroc)

Présentée et soutenue publiquement le : octobre 1972.

ETUDE VIROLOGIQUE ET IMMUNOLOGIQUE D'UNE VIROSE PERSISTANTE CHEZ LA SOURIS INFECTEE PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE MURINE (M. H. V. 3)

Président de Thèse : M. D. ALAGILLE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents.

Je remercie le Professeur Daniel ALAGILLE,
Directeur de l'Unité de Recherche d'Hépatologi
Infantile de l'I. N. S. E. R. M., à Bicêtre, d
ce travail a été réalisé, et qui m'a fait
l'honneur d'accepter la présidence de cette
thèse.

Cette thèse est dédiée à toute l'équipe du département d'immunologie de l'Unité de Recherche d'hépatologie infantile :

- Jean-Marie DUPUY
- Anne-Marie DURAND-VIEL
- Martine JOUSSET
- Danielle LAFORET
- Elisabeth LEBLOND
- Caroline LE PREVOST
- Maria VALLET.

Ce travail est autant le leur que le mien.

ETUDE VIROLOGIQUE ET IMMUNOLOGIQUE D'UNE VIROSE PERSISTANTE

CHEZ LA SOURIS INFECTEE PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE MURINE (M. H. V. 3)

I N T R O D U C T I O N

Le but de ce travail est de décrire un phénomène nouveau, jamais encore décrit avec le virus de l'hépatite murine : il s'agit d'une virose persistante, dûe au M. H. V. 3 (Virus de l'hépatite murine n° 3), et évoluant sous la forme d'une méningo-encéphalite chronique, avec signes neurologiques d'apparition retardée, d'évolution très lentement progressive, et finissant par entraîner la mort des souris dans un délai de plusieurs semaines à plusieurs mois.

Le plan de cet exposé comprendra successivement :

- une brève description des techniques, des matériels et des méthodes ;
- une étude virologique de cette maladie chronique ;
- une étude immunologique que nous avons volontairement, et un peu artificiellement, séparée de la précédente, pour la clarté de l'exposé.

Chaque expérience sera discutée pour elle-même, au fur et à mesure. Puis une discussion générale nous permettra de proposer une vision plus globale de ce modèle expérimental, et d'envisager un certain nombre d'analogies avec d'autres viroses animales, mais aussi avec certaines viroses humaines.

RAPPEL DES DONNEES DE LA LITTERATURE SUR LE M. H. V. 3

Découverte du M. H. V. 3

Dans le but de transmettre l'hépatite virale humaine à un animal de laboratoire, un groupe de souris (Swiss) fut un jour inoculé avec du sérum d'un patient atteint d'hépatite virale. Au bout de quelques jours, l'un des animaux mourut ; à l'autopsie, son foie était largement nécrosé. A partir d'une suspension de ce foie, de nouvelles souris furent inoculées, et moururent régulièrement. Des passages en série furent réalisés, et au vingtième passage, le foie des souris malades atteignait des titres de l'ordre de $10^{-7,5}$, et son inoculation entrainait régulièrement une hépatite fulminante.

L'expérience de transfert de l'homme à l'animal fut de nouveau tentée, mais échoua constamment. Dès lors, les auteurs conclurent qu'il s'agissait d'une coïncidence, et que le virus de l'hépatite ainsi découvert chez la souris ne provenait pas du sérum du sujet atteint d'hépatite, mais qu'il s'agissait d'un nouveau virus. Ce virus fut appelé M. H. V.-CRAIG (1) et, plus tard, M. H. V. 3 (2) (Mouse Hepatitis Virus n° 3)

Caractérisation du M. H. V. 3

Grâce aux procédés de filtration et à l'étude en microscopie électronique, on sait que le M. H. V. 3 mesure de 80 à 120 mμ (3).

Il semble s'agir d'un virus RNA (4).

On peut l'inactiver :

- en le chauffant à 56°C pendant 30 minutes (2) ;
- en l'exposant toute une nuit à une solution saturée d'éther à 4°C.

Le virus garde intacte son infectivité après conservation à - 70°C pendant plus de deux ans (2).

Il n'est pas détruit par un séjour de 30 minutes à 37°C en milieu acide (pH = 2,5) ou alcalin (pH = 9,5) (5).

Classification du M. H. V. 3

Le M. H. V. 3 n'a jamais encore été isolé à l'état pur, mais il paraît antigéniquement très proche du groupe des virus hépato-encéphalitiques de la souris (6, 7). On a démontré en effet (8) des relations antigéniques très étroites entre le M. H. V. 3 et le M. H. V. (P_2), le M. H. V. 1, le J. H. M.

Par ailleurs, le M. H. V. 3, le virus A 59, le virus H 747 portent des antigènes neutralisants et fixant le complément communs (9).

Tous ces virus ont en commun : leur taille moyenne ; leur multiplication intra-cytoplasmique ; leur antigène fixant le complément ; leur sensibilité à l'éther.

Dans ce groupe de virus hépato-encéphalitiques, c'est le M. H. V. 3 qui a été le mieux étudié.

L'hépatite due au M. H. V. 3

Le M. H. V. 3 ne produit d'hépatite que chez la souris. Aucun autre animal de laboratoire testé ne s'est montré susceptible (5).

De nombreuses espèces murines sont susceptibles, mais ce sont les souris Swiss de 3 à 4 semaines d'âge qui sont généralement utilisées.

1° Voies d'administration

Le virus donne une hépatite, quelle que soit la voie d'administration utilisée : intra-veineuse, intra-péritonéale, sous-cutanée, intra-cérébrale, ou orale (10). L'infection n'est pas transmise par contact, même chez les souris nées dans une cage contenant des souris infectées (2).

Le virus n'est pas transmis par voie transplacentaire (11).

.../...

Pour transmettre l'infection par voie orale, il faut des doses un million de fois plus fortes que celles employées par voie intra-péritonéale (12).

2° Aspect clinique de la maladie

Quelle que soit la voie d'inoculation, dès la 48ème à la 72ème heure, les souris ont une activité réduite, leurs poils deviennent graisseux et se hérissent ; leur perte de poids est rapidement considérable. La mort survient entre le 2ème et le 7ème jour après l'inoculation. A l'autopsie, le foie est pâle, d'un blanc jaunâtre. Rarement, quelques gouttes d'ascite sont découvertes.

Il s'agit donc toujours d'une hépatite suraiguë ; le passage à la chronicité n'a jamais été décrit avec le M. H. V. 3.

3° Aspect virologique de la maladie

PIAZZA et coll. (13) ont étudié le destin du virus après injection intra-veineuse chez les souris sensibles :

- 30 secondes après injection, le virus est présent presque exclusivement dans le sang, le foie et la rate ;

- à partir de la 40ème minute, et pendant 3 heures, le virus n'est détecté ni dans le sang ni dans aucun organe : c'est la phase d'éclipse, habituelle dans toutes les viroses, et pendant laquelle le virus, en plein cycle de reproduction, n'est provisoirement pas infectant ;

- à partir de la 4ème heure, le virus réapparaît, d'abord dans la rate et le foie ; presque immédiatement, la virose se généralise. Tous les organes, sans exception, montrent alors des titres considérables. Les titres les plus élevés sont trouvés peu avant la mort, dans le foie et la rate (de 10^{-8} à 10^{-9} LD 50). Ils sont un peu plus faibles dans le sang, le rein et le cerveau (de 10^{-6} à 10^{-7} LD 50). La mort est précédée d'une soudaine et très importante élévation du taux des transaminases sériques S. G. P. T.

... / ...

4° Aspect histologique

Dès la 24ème heure, des cellules géantes multinucléées, sont observées dans les divers organes étudiés. Puis des aires limitées (foci) de nécrose apparaissent de façon disséminée. Ces foci sont bientôt entourés d'une zone inflammatoire cellulaire, parfois hémorragique. Au 3ème jour, les aires de nécrose sont de grande taille, surtout dans le foie, qui est presque entièrement nécrosé, mais aussi, à un moindre degré, dans certains muscles, dans le cerveau et dans tous les organes lymphoïdes (rate, plaques de Peyer, thymus et ganglions lymphatiques).

En microscopie électronique, on observe au niveau des hépatocytes et des cellules de Kupffer, dès la 24ème heure, une condensation et une margination de la chromatine du noyau, avec des nucléoles de grande taille (3). Vers la 48ème heure, des particules virales peuvent être observées, mais toujours en quantité modeste dans le cytoplasme, alors qu'elles abondent dans l'espace intercellulaire de Disse, et dans les citernes ER dilatées (10, 14). Les virions se développent au contact des particules ribosomales, et reçoivent leur enveloppe en bourgeonnant à travers des membranes probablement dérivées du réticulum endoplasmique (15).

L'infection par le M. H. V. 3 *in vitro*, en cultures cellulaires

On a d'abord inoculé le M. H. V. 3 sur explants de foie provenant de foetus de souris C57 Bl., mis en culture selon la technique de HILLIS (16). Un effet cytopathique est observé dès le 3ème jour après inoculation. Les cellules épithéliales se détachent de la paroi et se lysent. Les fibroblastes restent indemnes. Le surnageant de ces cultures, inoculé à des souris sensibles, reproduit régulièrement une hépatite aiguë.

Sur des cellules embryonnaires de souris Swiss Webster, des plages de cytotoxicité apparaissent 48 heures après inoculation. Le nombre

... / ...

de plages est proportionnel à la concentration de virus dans le milieu. Il est donc possible de titrer le virus par cette méthode, mais cette technique est moins sensible que celle de la Dose Léthale 50 % (DL 50) *in vivo* (17).

Par ailleurs, avec un virus hépatitique extrêmement proche, le M. H. V. 2, BANG et coll. ont montré que la cellule cible des explants de foie était le macrophage (18) ; les macrophages de souris susceptibles répliquent le virus in vitro. Les macrophages de souris résistantes répliquent peu ou pas le virus *in vitro*. Cette équipe a également montré (19) que cette susceptibilité, *in vivo* et *in vitro*, était héréditaire et qu'elle se transmet comme un caractère dominant (20).

Neurotropisme du M. H. V. 3

On a vu qu'au cours de l'infection aiguë par le M. H. V. 3, les souris susceptibles, si elles meurent dans un tableau de grande nécrose hépatique, n'en ont pas moins une virose généralisée, et en particulier cérébrale. Au niveau du cerveau, les lésions sont très discrètes : à la 72ème heure, l'étude en microscopie électronique ne montre aucune altération des structures du neurone ; on observe simplement une discrète augmentation de volume des astrocytes, avec légère vacuolisation des cellules de l'oligodendroglie (5): seul le système réticulo-endothélial paraît concerné.

Toutefois, un variant neurotrope du M. H. V. 3 a pu être créé (2) à partir d'une souris inoculée par voie intra-péritonéale, et ayant présenté une paralysie flasque des membres inférieurs. Une suspension fut préparée à partir du cerveau de cet animal, et des passages en série furent réalisés par voie intra-cérébrale. Au bout du quinzième passage, tous les animaux inoculés présentaient des signes neurologiques,

cependant que l'hépatotropisme diminuait progressivement, mais sans jamais disparaître.

Une autre équipe (21) a pu également obtenir des signes encéphalitiques après passages en série par voie intra-cérébrale. Mais là encore, il s'agissait de maladies aiguës avec décès précoces.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

Virus

Le virus M. H. V. 3 nous a été aimablement fourni par le docteur ALLISON A. C. (Londres) sous forme d'une suspension à 20 p. cent de foie de souris. Ce virus est depuis régulièrement passé chez des souris sensibles (DBA/2), et conservé au réfrigérateur à - 70°C.

Souris

Toutes nos souris proviennent du Centre d'Elevage d'Orléans (centre de Sélection et d'Elevage d'Animaux de Laboratoire C. N. R. S. 45 - ORLEANS - LA SOURCE).

Parmi les diverses lignées testées :

- La lignée A est totalement résistante au M. H. V. 3, avec une survie de 100 p. cent, quelle que soit la dose de virus injectée. Nous avons pu montrer (22) que le virus disparaissait dès le sixième jour de tous les organes testés (foie, rate, sang, cerveau). Les titres de virus ne dépassent jamais 10^{-2} D. L. 50 par 0,1 ml.

- La lignée DBA/2 est au contraire totalement sensible, avec une mortalité de 100 p. cent, même aux doses faibles. Les titres de virus sont entre 10^{-4} et 10^{-5} dans tous les organes testés. Les décès surviennent entre le troisième et le septième jour après injection. L'histologie du foie montre constamment une nécrose hépatique majeure.

- Les lignées C_3H/He et C_3H/eb montrent jusqu'à l'âge de 8 semaines, une sensibilité totale, absolument comparable à celle de la lignée DBA/2. Quant à la semi-résistance, très particulière, des lignées

... / ...

C_3H après l'âge de 10 semaines, elle est le sujet de cette thèse.

METHODES

Préparation du virus

Le virus est injecté à des souris sensibles (DBA/2). Au quatrième jour après inoculation, les souris sont sacrifiées, leur foie est prélevé, broyé stérilement et suspendu dans neuf fois leur poids de solution physiologique tamponnée (P. B. S.). Cette suspension à 10 p. cent est centrifugée à 1 500 tours par minute pendant 10 minutes à 4°C, puis soniquée, enfin conservée au congélateur à - 70°C. Elle est toujours titrée en D. L. 50 par 0,1 ml.

Titration du virus

On définit arbitrairement la dose léthale 50 % (D. L. 50) comme la quantité de virus suffisante pour tuer 50 % d'un groupe de DBA/2 au sixième jour après l'inoculation. En pratique, des groupes de trois à six DBA/2 sont injectées par voie intra-péritonéale avec des dilutions croissantes de la suspension à tester. On calcule le pourcentage de décès au sixième jour dans chaque groupe, et on en déduit la dose intermédiaire qui aurait tué 50 % des animaux, selon la méthode de Reed et Muench.

Mise en évidence de virus dans les divers organes

Le microscope électronique nous a permis (22) de visualiser le virus dans les hépatocytes et les cellules de Kupffer des DBA/2 malades. Le virus apparaît comme une particule de 90 à 100 mμ, trouvé en nombre relativement faible, surtout visible au niveau des espaces de Disse.

En pratique, c'est par transmission de la maladie à partir d'un broyat d'organe que l'on met en évidence le virus : le broyat est injecté I. P. à un groupe de DBA/2. On s'assure que les décès surviennent dans les délais habituels, on vérifie par autopsie la nécrose hépatique,

... / ...

et l'on transmet éventuellement de nouveau la maladie à partir de ces foies pathologiques.

Voies d'administration du virus

On s'est assuré que toutes les voies d'administration (intra-veineuse, intra-péritonéale, intra-musculaire, sous-cutanée) avaient le même effet. En pratique, on a choisi la voie intra-péritonéale, du fait de sa simplicité.

Histologie

Les organes prélevés sont immédiatement fixés dans le formol à 10 p. cent, puis le Bouin alcoolique, enfin colorés par l'hématoxyline-éosine.

Prélèvements de sang

Deux méthodes ont été utilisées :

- soit l'animal est sacrifié ; on recueille le sang dans la cavité pleurale après section des gros vaisseaux, grâce à une pipette contenant 3 gouttes d'héparine diluée ;

- soit sans tuer l'animal : la souris est maintenue dans un cylindre qui l'engaine étroitement. L'extrémité de sa queue est sectionnée et saigne goutte à goutte dans le fond d'un tube à essai contenant 0,05 ml d'une solution d'héparine à 10 p. cent.

Prélèvements cellulaires

Les organes fraichement prélevés sont coupés finement au ciseau, puis les cellules sont dissociées mécaniquement en homogénéisateur dans un milieu de culture stérile (Hanks), centrifugées, lavées. On vérifie leur viabilité par coloration au bleu de Trypan et on les numère dans un hémocytomètre.

Sérum anti-lymphocytaire

Du sérum anti-lymphocytaire a été préparé dans notre laboratoire par injections répétées de lymphocytes de souris chez le lapin. Son

... / ...

efficacité a été testée par des épreuves de lymphotoxicité, et par ses capacités immunosuppressives chez les lignées de souris résistantes au M. H. V. 3. (23).

... / ...

ETUDE VIROLOGIQUE

EXPERIENCE N° 1

Mise en évidence de la virose persistante.

Nous avons vu que, aussi bien dans la littérature que dans notre expérience personnelle, les diverses lignées de souris répondent au M. H. V. 3 par la loi du tout ou rien. Certaines lignées sont absolument résistantes (lignée A), d'autres sont absolument susceptibles (lignées DBA/2, C_{57} B1/6, NZB, C_3H de moins de dix semaines, etc...).

Dans un groupe de souris susceptibles injectées avec une dose standard de M. H. V. 3 (0,1 ml de suspension de foie à 10^{-1}), on observe 100 p. cent de décès en moins d'une semaine. La lignée C_3H/He ne fait pas exception à cette règle.

Aussi notre surprise a-t-elle été grande lorsque, dans un groupe de C_3H/He injecté par voie habituelle (intra-péritonéale) avec une dose standard de M. H. V. 3, aucun décès ne survint au cours de la première semaine, les souris restant en excellent état général. Ce groupe pouvait donc paraître "résistant". Les souris ne furent pas sacrifiées, mais au contraire, conservées et surveillées. Dans les semaines qui suivirent, les animaux perdirent progressivement du poids, diminuèrent leur activité spontanée ; leur poils se hérissèrent ; surtout, certaines souris commencèrent à présenter des signes manifestes d'atteinte neurologique : troubles de l'équilibre et de la coordination, paralysies d'un ou plusieurs membres. Pas de convulsion. La surveillance fut maintenue longuement, et toutes les souris finirent pas mourir dans un tableau de cachexie extrême et de

... / ...

paralysies multiples. L'évolution est lentement progressive, et se poursuit, dans certains cas, plus de six mois. Au total, chez ces souris, on assistait à une maladie chronique, manifestement neurologique, évoquant une méningo-encéphalite chronique, très différente de l'hépatite suraiguë dont est habituellement responsable le M. H. V. 3.

La seule différence entre ce groupe de C_3H/He et les autres groupes de C_3H/He évoluant de façon aiguë, résidait dans l'âge des animaux. Le groupe présentant une maladie chronique avait été injecté à l'âge de 11 mois, les groupes évoluant "normalement" étaient injectés à l'âge de 4 à 8 semaines.

Un protocole fut donc mis en route, utilisant de nouveau des C_3H/He âgées de 11 mois, et destiné à mettre en évidence une persistance du virus au niveau de l'encéphale, du foie et de la rate.

1° Technique

Neuf C_3H/He, âgées de 11 mois, furent injectées par voie intra-péritonéale, avec 0,1 ml de suspension de foie à 20 p. cent.

Au jour 4 après inoculation, puis une fois par semaine pendant 5 semaines, une suspension à 10 p. cent de rate, de foie et de cerveau fut prélevée à partir d'une souris choisie au hasard. Trois souris moururent spontanément entre le 7ème et le 30ème jour, et ne furent donc pas prélevées. 0,1 ml de chaque suspension d'organe fut injecté par voie intra-péritonéale à trois souris DBA/2 adultes.

2° Résultats (tableau I)

Au 4ème jour, le virus était présent dans le foie, la rate et le cerveau de la souris testée.

Dès le 11ème jour, le virus apparemment disparu, de la rate et du foie, tout au moins compte tenu de la quantité de suspension d'organe injectée.

... / ...

TABLEAU I

PERSISTANCE DU VIRUS AU NIVEAU DE LA RATE, DU FOIE ET DU CERVEAU

AU COURS DE LA MALADIE CHRONIQUE

JOUR DU PRELEVEMENT	PRODUIT INJECTE	NOMBRE DE DECES/ NOMBRE DE SOURIS TESTEES (1)		
		RATE	FOIE	CERVEAU
4	(2)	3/3	3/3	3/3
11	(2)	0/3	0/3	3/3
18	(2)	0/3	0/3	2/3
25	(2)	0/3	0/3	3/3
32	(2)	0/3	0/3	2/3
39	(2)	0/3	0/3	2/3

(1) Souris DBA/2 adultes (sensibilité au MHV3 = 100 %)

(2) 0,1 ml de suspension d'organes à 10 %

Du 11ème au 39ème jour de l'expérience, le virus est constamment retrouvé dans le cerveau.

3° Discussion

a) Ainsi, la persistance du virus a été démontrée, puisqu'au 39ème jour, les suspensions de cerveau transmettent toujours la maladie.

b) Il s'agit bien de la persistance du virus M. H. V. 3, puisque son injection à des DBA/2 reproduit en tous points la maladie habituelle ; les décès des DBA/2 survenant en moins de 7 jours, et l'autopsie montrant une nécrose hépatique caractéristique.

c) Il ne s'agit pas d'un variant neurotrope du M. H. V. 3, puisque c'est une maladie hépatique aiguë qui est d'emblée transmise aux souris sensibles.

d) La maladie paraît évoluer en deux phases :

- l'une de début, durant une semaine environ, pendant laquelle la virose est généralisée, avec présence du virus dans les trois organes testés. Cette phase est très comparable à la maladie aiguë des souris sensibles, mais n'entraîne pas le décès de l'animal dans deux tiers des cas environ.

- Une deuxième phase, chronique, pendant laquelle, avec la technique utilisée dans cette expérience, le virus n'est retrouvé qu'au niveau du cerveau. Il est intéressant de rapprocher ce fait du caractère neurologique des symptômes cliniques.

e) Du point de vue histologique, l'étude des différents organes au cours de la phase chronique a montré (22) :

- au niveau du cerveau : quelques plages de nécrose très discrète, avec une réaction inflammatoire faite de mononucléaires et de lymphocytes, prédominant au niveau des méninges, des tissus péri-ventriculaires et du plexus choroïdien.

- Au niveau du foie : quelques ilôts de nécrose hépatocytaire isolés, sans infiltration inflammatoire, sauf exception.

- La rate est hyperplasique, avec gros centres germinatifs.

- Les ganglions, les plaques de Peyer et le thymus sont peu modifiés.

- Enfin, les glomérules rénaux sont denses et hypercellulaires avec prolifération endo-capillaire.

EXPERIENCE N° 2

Influence de l'âge sur l'évolution de la maladie dans la lignée C_3H/He

1° Technique

Afin de vérifier le rôle de l'âge sur la proportion respective des maladies aiguës et des maladies chroniques, des groupes de 16 à 20 C_3H/He d'âge variable ont été injectés le même jour, par voie intra-péritonéale, avec la même dose du même lot de virus : 0,1 ml de suspension de foie à 10 p. cent. La date des décès a ensuite été consignée, pour chaque groupe, pendant deux mois.

2° Résultats (tableau II)

Jusqu'à l'âge de deux mois, les C_3H/He ont une mortalité aiguë de 100 p. cent en moins de 7 jours ;

La possibilité de chronicité de la maladie n'apparaît qu'à partir de l'âge de 3 mois. A cet âge, le premier décès ne survient qu'au 51ème jour après inoculation.

Plus l'âge des souris croît, plus la proportion de décès précoces augmente.

3° Discussion

Il est surprenant de voie une lignée, dont la sensibilité est aiguë depuis la naissance jusqu'à l'âge de 2 mois, acquérir une sorte

... / ...

TABLEAU II

INFLUENCE DE L'AGE SUR LA MALADIE DES SOURIS C_3H/He

NOMBRE DE SOURIS TESTEES	AGE DES SOURIS TESTEES	NOMBRE DE DECES avant 15 j.	NOMBRE DE DECES entre 15 et 60 j.	TOTAL au 60ème j.
20	4 semaines	20	0	20
20	8 semaines	20	0	20
16	3 mois	0	1	1
20	4 mois	1	2	3
16	8 mois	2	5	7
18	10 mois	5	6	11

de "résistance" à la maladie aiguë, totale à l'âge de 3 mois, puis de nouveau de moins en moins nette au fur et à mesure du vieillissement. Cette modification de la sensibilité d'une lignée au virus nous paraît anormalement tardive. Nous avons pu montrer (22) que la lignée A, résistante à l'âge adulte, acquiert cette résistance entre les 16ème et 21ème jours de leur vie, ce qui est habituel en matière de virologie murine.

Chez nos C_3H/He, l'apparition tardive, vers la huitième semaine, d'une semi-résistance évoque soit une "maturation immunologique" anormalement lente, soit un parasitisme associé de la lignée C_3H/He, qui conférerait aux animaux une résistance relative au M. H. V./3, suffisante pour les protéger de la maladie aiguë, mais insuffisante pour débarrasser complètement l'organisme du virus.

On sait que la lignée C_3H/He est susceptible au virus de Gross. Toutefois, ce virus ne peut être ici en cause, puisque nous avons vérifié (22) que la sous-lignée C_3H/eb, non susceptible au virus de Gross, est capable de faire une maladie chronique par le M. H. V. 3, d'un type tout à fait analogue à celle des C_3H/He.

Outre les lignées C_3H (He et eb), d'autres lignées testées ont montré la même évolution chronique : c'est le cas des souris CBA et AKR. Il faut remarquer que toutes ces lignées "semi-résistantes" au M. H. V. 3 ont un point commun : l'existence du même locus d'histocompatibilité H_2K. D'autres travaux seront nécessaires pour faire la preuve d'un parallélisme significatif entre la présence du locus H_2K et la semi-résistance au M. H. V. 3.

EXPERIENCE N° 3

Répartition du virus dans l'organisme au cours de la virose persistante

A - Exploration de 11 C_3H/He paralysées au 26ème jour de la maladie.

1° Technique

Onze souris C_3H/He, toutes présentant des paralysies au 26ème jour après inoculation intra-péritonéale de 0,1 ml de suspension de M. H. V. 3 à 10 p. cent, furent sacrifiées. Des suspensions à 10 p. cent furent préparées à partir de leur cerveau, de leur foie ; leur plasma fut également recueilli selon la technique habituelle (cf. chapitre Matériel et méthodes). Les suspensions de chacun de ces trois organes fut poolé, et la présence de virus fut recherchée par transmission à 5 DBA/2 par dilution et par organes.

2° Résultats (tableau III)

- Au niveau du cerveau : toutes les dilutions, du 1/10 au 1/10 000, furent incapables de transmettre la maladie. 0,1 ml de suspension non diluée (1/1) ne donne qu'un décès sur cinq DBA/2. Il faut injecter une dose dix fois supérieure (10/1) soit 1 ml de suspension non diluée pour obtenir trois décès sur cinq.

- Au niveau du foie : 0,1 ml de suspension à 10 p. cent non diluée n'entraine aucun décès.

- 0,1 ml de plasma non dilué n'entraine aucun décès.

3° Discussion

L'expérience n° 1 ne portait que sur une seule souris chaque semaine. Ces résultats sont ici confirmés sur un pool de 11 souris. Ici encore, avec des doses standard, seul le cerveau paraît porteur chronique de virus. L'absence de virus infectant présent dans le plasma témoigne, par ailleurs, en faveur d'une immunité circulante de bonne qualité ; nous reverrons ce problème.

... / ...

TABLEAU III

RECHERCHE DE VIRUS AU NIVEAU DU CERVEAU, DU FOIE ET DU PLASMA

CHEZ 11 C_3H/He AU 26ème JOUR DE LEUR MALADIE

DILUTION DU BROYAT	NOMBRE DECES/NOMBRE SOURIS TESTEES (1)		
	CERVEAU (2)	FOIE (2)	PLASMA (2)
10/1	3/5	NT (3)	NT
1/1	1/5	0/5	0/5
10^{-1}	0/5	NT	NT
10^{-2}	0/5	NT	NT
10^{-3}	0/5	NT	NT
10^{-4}	0/5	NT	NT

(1) Lignée DBA/2

(2) Pool d'organes des 11 animaux testés.

(3) NT = Non testé.

Surtout, le rôle des dilutions des broyats d'organes injectés paraît ici fondamental ; si notre dose standard avait été du 1/10, aucun décès ne serait survenu, même à partir du cerveau, et la présence du virus n'aurait jamais été décelée. Il était évident que l'expérience devait être reprise avec des doses supérieures. Ceci est l'objet de l'expérience suivante.

B - Exploration de 10 C_3H/He paralysées, en utilisant des doses importantes

1° Technique

Dix C_3H/He évoluant depuis 38 à 73 jours depuis leur inoculation, furent réunies avec, comme critère, l'existence de troubles neurologiques.

Un broyat de foie fut réalisé, souris par souris, avec une concentration considérable au 1/2, et injecté en quantité importante : 0,8 ml par DBA/2, à dix DBA/2, équivalent de un tiers du poids d'un foie entier.

Les rates des dix C_3H/He paralysées furent prélevées et poolées: une partie fut broyée, suspendue au 1/5 ; cette suspension fut injectée à deux DBA/2, 0,6 ml par souris. L'autre partie fut dissociée, les cellules numérées, lavées ; leur viabilité (95 %) fut vérifiée ; 1×10^8 cellules furent injectées par voie intra-péritonéale par souris à six C_3H/He de moins de 2 mois (sensibles).

La même opération fut répétée à partir de ganglions lymphatiques axillaires, inguinaux, aortiques et mésentériques. Une partie fut injectée sous forme d'une suspension à deux DBA/2. Le reste, sous forme de cellules viables soigneusement labées, fut injecté par voie intra-péritonéale, à quatre C_3H/He de moins de 2 mois.

2° Résultats (tableau IV)

A partir de la suspension de foie, 2 décès sur 10 furent observés.

A partir de la suspension de rate : 2 décès sur 2.

... / ...

TABLEAU IV

MISE EN EVIDENCE DU VIRUS PAR DE FORTES DOSES D'EXTRAIT D'ORGANES

A PARTIR DE 10 C_3H/He PRELEVEES ENTRE LE 38° ET LE 73° JOUR DE LEUR MALADIE

PRODUIT INJECTE PAR ANIMAL	RECEVEURS	DECES/SOURIS TESTEES
0,4 g de foie ≃ 1/3 d'organe	DBA/2	2/10
0,1 g de rate ≃ 1 rate entière	DBA/2	2/2
1×10^8 cellules spléniques ≃ 1 rate entière	C_3H/He (1)	4/6
0,1 g de tissu ganglionnaire	DBA/2	1/2
15×10^6 cellules ganglionnaires	C_3H/He (1)	4/4

(1) C_3H/He de moins de 2 mois.

A partir de cellules spléniques viables : 3 décès sur 4.

A partir de suspension ganglionnaire : 1 décès sur 2.

A partir de cellules ganglionnaires viables : 4 décès sur 4.

3° Discussion

a) Au niveau du foie :

Grâce à la quantité énorme de suspension hépatique injectée dans ce protocole (équivalent de un tiers à un foie) la preuve de la persistance du virus au niveau du foie a été apportée. Mais la nécessité de doses de cette importance indique que le titre est extrêmement faible.

b) D'autre part, le virus est également présent dans les organes lymphoïdes, rate et ganglions lymphatiques, puisque les broyats de ces organes transmettent la maladie. La quantité de virus paraît plus grande dans ces organes qu'au niveau du foie.

c) Le virus y persiste vraisemblablement de façon intra-cellulaire, puisque les cellules ganglionnaires et spléniques, correctement lavées, transmettent également la maladie.

En conclusion de cette étude virologique, nous avons pu montrer que :

- dans la lignée C_3H/He, à partir de l'âge de 10 semaines, le M. H. V. 3 est capable de produire spontanément une virose persistante pendant plusieurs mois ;

- il ne s'agit pas d'un variant neurotrope, mais du M. H. V. 3 non modifié, à l'hépatotropisme conservé ;

- les titres du virus sont nettement plus élevés dans le cerveau que dans tout autre organe ;

- le virus paraît rester strictement intra-cellulaire ; aucun virus ne circule à l'état infectant dans le sang ;

- il s'agit d'une virose généralisée, avec présence de virus

... / ...

à des titres extrêment faibles dans tous les organes testés ;

- le seul tissu cellulaire commun aux divers organes chroniquement porteurs du virus est le tissu immunologique : c'est en particulier le cas du tissu ganglionnaire, composé presque exclusivement de lymphocytes et de macrophages. Le système réticulo-endothélial, sous forme d'histiocytes et de macrophages, est présent dans tous les viscères ; au niveau du cerveau, il est présent en quantité très importante, sous forme d'astrocytes et de tissu glial.

On sait par ailleurs que le macrophage est la cellule cible du M. H. V. 3. Tout porte donc à croire que le virus persiste, dans notre modèle, au niveau du système réticulo-endothélial.

ETUDE IMMUNOLOGIQUE

Afin de tenter d'élucider les mécanismes de cette persistance virale, une étude immunologique a été réalisée au cours de la virose chronique.

EXPERIENCE N° 4

Etude des index spléniques des souris chroniquement malades

L'index splénique (I. S.) est le rapport du poids de la rate et du poids total de l'animal. Nous avons choisi de l'exprimer en proportion rapportée à mille grammes de poids total, donc au millième.

1° Matériel

Les pesées ont été effectuées sur 10 C_3H/He au 26ème jour de leur maladie. Ces dix souris présentaient les signes d'une maladie chronique, et trois d'entre elles montraient des signes neurologiques manifestes. Le jour de leur sacrifice (J 26), une suspension poolée de leurs foies contenait du M. H. V. 3 (tableau III).

2° Résultats (tableau V)

- L'I. S. des C_3H/He du même âge est de 4,50.
- L'I. S. moyen des 10 souris malades est de 9,45.
- L'I. S. moyen des 3 souris paralysées est de 5,86.
- L'I. S. moyen des 7 souris non paralysées est de 10,99.

3° Discussion

Après contact avec un antigène, l'index splénique est ordinairement un excellent témoin de l'état d'immunisation d'un animal. Plus il est élevé, plus l'animal est immunisé.

... / ...

TABLEAU V

INDEX SPLENIQUE DE 10 C_3H/He AU 26ème JOUR DE LA MALADIE

SOURIS	ETAT CLINIQUE	POIDS DU CORPS (g)	POIDS DE LA RATE (g)	I.S.	Moyennes IS
1	P (1)	15,9	0,09	5,66	
2	P	13,9	0,09	6,47	5,86
3	P	18,3	0,10	5,46	
4	M (2)	18,1	0,15	8,28	
5	M	30,5	0,21	6,88	
6	M	26,6	0,39	14,60	
7	M	25,5	0,20	7,84	
8	M	19,9	0,20	10,00	10,99
9	M	22,5	0,50	22,20	
10	M	28,0	0,20	7,14	

MOYENNE GENERALE = 9,45

I.S. Normal = 4,50

(1) P = souris paralysée.

(2) M = souris malade mais non paralysée.

Chez nos dix souris au 26ème jour de leur maladie, l'index splénique moyen (9,45) est nettement supérieur à l'index splénique moyen des souris témoin normales de la même espèce et du même âge (4,50). Il semble donc que les souris chroniquement malades jouissent d'une excellente immunisation, vraisemblablement dirigée contre le M. H. V. 3. Les rates prélevées sont histologiquement très stimulées, avec gros centres germinatifs. Le virus persisterait donc malgré la réaction normale du système immunologique, destinée à débarrasser l'organisme de l'antigène viral.

Par ailleurs, il est frappant de comparer l'index splénique moyen des souris paralysées, à peine supérieur à l'index splénique des souris non infectées, avec l'index splénique moyen des souris sans signe neurologique, très supérieur à l'index splénique témoin.

Trois interprétations sont possibles :

- Les souris déjà paralysées au J 26 n'ont pas eu le temps ou la possibilité de s'immuniser ; d'où la rapidité évolutive de la maladie. Cette hypothèse est peu vraisemblable, car nous verrons plus loin que les souris paralysées ont une immunité anti-M. H. V. de bonne qualité.

- Ou bien les souris paralysées se sont normalement immunisées, mais, parallèlement aux lésions neurologiques, se sont créées des lésions tissulaires au niveau de tous les organes infectés, en particulier au niveau de la rate. La destruction progressive des structures spléniques ferait alors diminuer le poids total de l'organe, antérieurement normalement élevé ou même hypertrophié.

Nous reverrons ce problème pathogénique lors de la discussion générale, à la fin de notre exposé.

- Enfin, il est possible que les souris paralysées soient soumises à un "stress" plus important. Or, tout stress s'accompagne chez la souris d'une déplétion en lymphocytes des organes lymphoïdes.

... / ...

EXPERIENCE N° 5

Etude de l'immunité humorale anti-M. H. V. 3 au cours de la virose chronique

1° Matériel

Deux groupes de souris malades ont été étudiées :

- un groupe de 11 C_3H/He au 26ème jour de la maladie ;
- un groupe de 10 C_3H/He au 42ème jour de la maladie.

Les animaux ont été sacrifiés, et leur sang a été immédiatement recueilli sur héparine et centrifugé à 3 000 tours par mn pendant dix minutes.

2° Technique de la neutralisation

Le plasma est utilisé non dilué ou dilué à 1/10 dans un liquide physiologique tamponné (P. B. S.).

Dans tous les cas, la suspension virale utilisée est diluée au 1/100.

Le plasma et la suspension virale sont mis en contact en quantité égale, dans un tube à essai déposé dans un agitateur, à la température du laboratoire, pendant 30 ou 60 minutes selon les cas.

0,2 ml de cette solution sont ensuite injectés par voie intra-péritonéale à des souris sensibles (DBA/2). Chaque souris reçoit ainsi 0,1 ml de plasma et 0,1 ml de suspension virale au 1/100.

Dans chaque expérience, trois DBA/2 témoins sont injectées par voie intra-péritonéale avec 0,1 ml de suspension virale au 1/100 sans plasma, ce qui correspond à une dose infectante supérieure à la dose léthale 100 au 7ème jour.

3° Résultats : tableau VI

a) Avec un temps de contact court : 30 mn, la neutralisation est médiocre :

- à partir de plasma prélevé au 26ème jour :

. deux décès sur trois avec le plasma non dilué ;

... / ...

TABLEAU VI

ACTIVITE NEUTRALISANTE IN VITRO DU PLASMA DE SOURIS CHRONIQUEMENT MALADES

DUREE INCUBATION (mn)	ANTICORPS Origine	Dilution	Nbre DL 50 injectées	DECES/DBA_2 TESTEES au 7ème jour
30	Pool plasma 11 C_3H/He $J^3$26	1/1	15	2/3
	id.	1/10	15	1/3
	10 plasmas C_3H/He J^3 42	1/1	15	10/10
60	Pool plasma 10 C_3H/He $J^3$42	1/1	15	0/3
	id.	1/10	15	1/3
	0	0	15	10/10

. un décès sur trois avec le plasma dilué au 1/10.

- à partir de plasma prélevé au 42ème jour :

. dix décès sur dix avec le plasma non dilué.

b) Avec un temps de contact plus long : 60 mn, la neutralisation est nette :

- aucun décès sur trois avec le plasma non dilué ;
- un seul décès sur trois avec le plasma dilué au 1/10.

4° Discussion

La présence d'anticorps anti-M. H. V. 3, neutralisants *in vitro*, a ainsi été démontrée chez des souris chroniquement infectées par le virus. Cette activité neutralisante du sérum est incontestable, mais elle paraît relativement modeste ; elle n'est franche qu'après un contact d'une heure, et elle n'est totale qu'avec du plasma non dilué, *in vitro*.

In vivo, toutefois, l'activité neutralisante du sérum paraît suffisante, puisqu'il ne nous a jamais été possible de transmettre la maladie à partir du sérum d'animaux malades, porteurs de virus dans divers viscères. Tout se passe donc comme s'il existait *in vivo* une immunité circulante suffisante pour empêcher toute virémie persistante ; comme cette immunité humorale est difficile à mettre en évidence *in vitro* par la technique de la neutralisation, il est permis de penser qu'elle n'est pas, *in vivo*, le fait des seuls anticorps neutralisants ; d'autres anticorps sont peut-être en cause, agglutinants, fixant le complément, etc... En outre, ces résultats permettent de prévoir que l'immunité de type cellulaire est l'élément déterminant.

EXPERIENCE N° 6

Etude de l'immunité anti-M. H. V. 3 de type cellulaire au cours de la virose chronique

1° Matériel

Les deux groupes de souris, déjà testés dans l'expérience précédente (n° 5) du point de vue de leur immunisation humorale, ont été ici testés du point de vue de leur immunisation de type cellulaire :

Groupe 1 : un groupe de 11 C_3H/He au 26ème jour de la maladie.

Groupe 2 : un groupe de 9 C_3H/He au 42ème jour de la maladie.

Tous ces animaux étaient cliniquement malades.

2° Technique

Un transfert passif de l'immunité cellulaire a été effectué à partir de cellules spléniques viables, immédiatement suivi par une injection intra-péritonéale de 0,1 ml d'une suspension de M. H. V. 3 à 1/100.

Groupe 1 : 750×10^6 cellules provenant du pool des 11 rates ont été injectées par voie intra-veineuse à 5 C_3H/He de moins de deux mois (donc d'une sensibilité totale au virus), soit 150×10^6 cellules par receveur.

Groupe 2 : le prélèvement et le transfert de cellules spléniques a été effectué animal par animal. Les cellules spléniques viables des 9 souris malades (entre 60 et 220×10^6 cellules selon les animaux) ont été injectées par voie intra-veineuse à 9 C_3H/He de moins de deux mois.

Un groupe témoin, comportant un transfert de cellules spléniques non suivi d'injection de virus, n'a volontairement pas été réalisé au cours de ce protocole. L'expérience a en effet déjà été réalisée (expérience n° 3 tableau IV), et a montré la présence de virus au niveau des cellules spléniques transférées.

3° Résultats : tableau VII

- Dans le groupe 1, aucun décès n'est survenu dans les sept premiers jours chez les receveurs C_3H/He sensibles. Par contre, des maladies chroniques sont survenues chez les cinq animaux testés, avec décès au Jour 42, 44, 48, 48, 52. La souris décédée au J 44 a été autopsiée. Une suspension de foie a transmis une hépatite aiguë à deux DBA/2 ; une suspension de son cerveau a également transmis la maladie aiguë à deux DBA/2.

- Dans le groupe 2, sur neuf animaux receveurs, cinq sont décédés avant le 7ème jour, dans un tableau d'hépatite aiguë. Les quatre autres ont développé une maladie chronique avec décès après le 31ème jour.

4° Discussion

Au 26ème jour de leur maladie, les animaux présentent une immunité cellulaire anti-M. H. V. 3 excellente, puisque leurs cellules spléniques sont capables de protéger huit receveurs sur huit de l'hépatite aiguë.

Il faut noter qu'au 42ème jour de la maladie, la protection est moins nette, comme si la qualité de l'immunisation diminuait progressivement. Peut-être faut-il voir là l'effet d'une toxicité progressive de la maladie sur les organes lymphoïdes ; ceci rejoindrait la notion (expérience n° 4) d'un index splénique d'autant plus faible que la maladie est plus évoluée et les paralysies plus nettes.

Enfin, un élément nouveau est à noter : on observe, chez les C_3H/He de moins de deux mois protégées de l'hépatite aiguë par le transfert de cellules immunes, non pas une guérison totale, mais une évolution chronique, absolument semblable à la maladie chronique des C_3H/He de plus de deux mois. Ainsi, l'existence de lymphocytes immuns B et T circulants paraît incapable d'éradiquer complètement le virus de l'organisme, et la phase chronique de la maladie se déroule normalement, comme si son évolution

... / ...

TABLEAU VII

PROTECTION OBTENUE PAR TRANSFERT DE CELLULES SPLENIQUES PROVENANT D'ANIMAUX CHRONIQUEMENT MALADES

ORIGINE DES CELLULES SPLENIQUES TRANSFEREES	DOSE INFECTANTE en DL 50	NOMBRE CELLULES TRANSFEREES PAR ANIMAL	DECES/RECEVEURS (1)
11 C_3H/He J 26 Pool	15	150×10^6	0/8
9 C_3H/He J 42	15	$> 60 < 220 \times 10^6$	5/9
0	15	0	6/6

(1) Receveur : C_3H/He de moins de 2 mois.

était strictement indépendante de l'état d'immunisation de l'animal.

Une autre constatation rejoint cette conclusion. En effet, dans notre expérience n° 5, les souris DBA/2 ayant été protégées du décès précoce par l'injection de virus neutralisé *in vitro*, ont deux possibilités évolutives. Certaines survivent en excellente santé, d'autres développent une maladie chronique. Nous avons pu montrer (22) que cette maladie chronique est associée à la persistance du M. H. V. 3 dans les divers organes testés (cerveau, foie), mais que, au contraire de ce que nous venons de voir chez les C_3H/He chroniquement malades, aucune immunisation humorale ni cellulaire n'était décelable.

Ainsi, la phase chronique de la maladie paraît toujours se dérouler de façon immuable, quel que soit l'état d'immunisation de l'animal : nul chez les DBA/2 artificiellement protégées du décès précoce par anticorps transmis ; de bonne qualité, au contraire, chez les C_3H/He, chez lesquelles le virus persiste malgré une réponse humorale et surtout cellulaire incontestable.

EXPERIENCE N° 7

Immunodépression au long cours chez les C3H/He chroniquement malades

1° Technique

Quatre groupes de 5 C_3H/He âgées de six mois ont été injectés par voie intra-péritonéale avec 0,1 ml de suspension virale non diluée.

Pendant deux semaines, aucune thérapeutique n'a été pratiquée.

A partir du 15ème jour (J 0 de l'expérience) les groupes ont été traités comme suit :

- groupe 1 : sérum anti-lymphocytaire : 2 injections intra-péritonéales par semaine, à la dose de 0,4 ml par animal.
- groupe 2 : Azathioprine (Imurel), trois injections par semaine, à la dose

... / ...

de 0,25 mg par animal.

- groupe 3 : témoins mâles : deux injections intra-péritonéales.

- groupe 4 : témoins femelles : deux injections intra-péritonéales, par semaine, de sérum normal de lapin, à la dose de 0,4 ml.

Dans chacun des groupes, l'évolution a été surveillée jusqu'au 60ème jour, et la date des décès notée.

2° Résultats : tableau VIII

Aucune différence significative n'a été observée dans la date de survenue des décès.

La moyenne des durées de survie dans chaque groupe est de :

- 42 jours pour le groupe 1 ;
- 37 jours pour le groupe 2 ;
- 41 jours pour le groupe 3 ;
- 49 jours pour le groupe 4.

3° Discussion

Le sérum anti-lymphocytaire et l'Azathioprine sont deux puissants immunosuppresseurs. Nous avons pu montrer (22) que ces deux produits, employés aux mêmes doses, rendent sensibles à 100 p. cent la lignée A, spontanément résistante au M. H. V. 3. Ici, au contraire, l'immunodépression ainsi réalisée ne modifie en rien l'évolutivité de la maladie chronique. Une fois passée la phase "aiguë" de la maladie, il semble bien que la persistance du virus et l'importance des lésions tissulaires soient strictement indépendantes de l'état d'immunisation de l'animal.

TABLEAU VIII

EFFET DE L'IMMUNODEPRESSION CHRONIQUE
SUR L'EVOLUTION DE LA VIROSE CHRONIQUE

NOMBRE D'ANIMAUX TESTES	PRODUIT INJECTE	PERIODICITE DES INJECTIONS	MOYENNE DE SURVIE (jours)
5	sérum anti-lymphocytaire 0,4 ml	2/semaine	42
5	Azathioprine 0,25 mg	3/semaine	37
10	Sérum normal lapin 0,4 ml	2/semaine	45

D I S C U S S I O N G E N E R A L E

Au terme de cette étude, un certain nombre de traits généraux de cette virose persistante par le M. H. V. 3 peuvent être dégagés. Leur discussion va permettre d'envisager la pathogénie de cette maladie, et en particulier les causes de la persistance du virus et le mécanisme des lésions tissulaires.

I RESUME DES FAITS EXPERIMENTAUX ET PROFIL DE LA MALADIE

Les résultats des expériences que nous venons de décrire autorisent un certain nombre de conclusions :

1° La lignée de souris C_3H/He, infectée à l'âge adulte par le virus de l'hépatite murine M. H. V. 3, présente une maladie chronique, évoluant, selon les animaux, pendant quelques jours à quelques mois. Ces souris présentent de façon caractéristique des symptômes cliniques d'atteinte neurologique associant à des degrés variables des paralysies des membres et des troubles de la coordination et de l'équilibre. La maladie est constamment mortelle.

L'étude histologique a montré : au niveau du cerveau, des plages de nécrose discrète, avec une réaction inflammatoire faite de mononucléaires et de lymphocytes, prédominant au niveau des méninges, des tissus péri-ventriculaires et du plexus choroïdien ; au niveau du foie, quelques îlôts de nécrose hépatocytaire, sans infiltration inflammatoire importante ; enfin, la rate et les ganglions lymphatiques montrent des images de stimulation antigénique, avec hyperplasie des centres germinatifs.

... / ...

2° Cette maladie chronique est constamment associée à la persistance du virus M. H. V. 3 au niveau de divers organes. Tous les animaux malades ont été trouvés porteurs de virus, et ceci tout au long de l'évolution et jusqu'à la mort.

Il s'agit bien du virus de l'hépatite et non d'un contaminant, puisque les prélèvements au niveau des organes malades transmettent aux souris sensibles une hépatite aiguë caractéristique, que l'on peut repasser en série.

Il ne s'agit pas d'un variant neurotrope du M. H. V. 3, puisque son hépatotropisme reste intact dès le premier passage aux animaux sensibles.

Il s'agit donc d'un modèle expérimental original, puisqu'une virose persistante par le virus de l'hépatite murine n'avait jamais été décrite jusqu'à ce jour.

3° Il s'agit d'une virose généralisée. Certes, les titres du virus sont plus élevés dans le cerveau que dans tout autre organe, en rapport avec la symptomatologie neurologique prédominante. Mais la preuve de la persistance virale au niveau du foie, de la rate et des ganglions lymphatiques a pu être faite ; les titres y sont très faibles, de l'ordre de 1 D. L. 50 pour une rate entière, par exemple.

4° Le virus paraît être strictement intra-cellulaire ; en effet, la maladie n'a jamais pu être transmise à partir du sérum des animaux malades. Par ailleurs, la maladie est transmissible par des cellules spléniques ou ganglionnaires vivantes dissociées et lavées.

Le seul "dénominateur commun" entre les divers tissus chroniquement infectés est le système réticulo-endothélial. Par ailleurs, BANG et coll. ayant montré que le macrophage est la cellule-cible du virus de l'hépatite murine, il est logique de penser que la persistance virale

... / ...

se fait au niveau des macrophages du système réticulo-endothélial, disséminés dans tout l'organisme. Des études en microscopie électronique et en immuno-fluorescence, entreprises dans notre laboratoire, devraient pouvoir apporter la preuve de cette hypothèse.

5° Le virus persiste malgré une réponse immune normale. Nous avons pu en effet démontrer que les animaux chroniquement porteurs de virus développaient une immunité anti-M. H. V. 3 de bonne qualité, avec présence d'anticorps neutralisants dans le sérum et de lymphocytes immuns. Le transfert passif de cette immunité protège efficacement les souris sensibles de l'hépatite aiguë ; ces animaux, guérissant ainsi de la phase hépatitique aiguë de la maladie, développent alors une maladie chronique avec virose persistante, absolument semblable à la maladie des C_3H/He. Une différence capitale entre ces deux viroses chroniques est à noter : lorsque les animaux sensibles (DBA/2) sont protégés du décès "aigu" par un transfert passif d'anticorps, la virose chronique s'installe sans qu'aucune immunité circulante décelable puisse être mise en évidence (après disparition des anticorps transmis).

6° L'évolutivité de la maladie ne paraît pas fonction de l'intensité de la réponse immune. En effet, il nous a été impossible d'accélérer ou de retarder l'évolution en modifiant l'état d'immunisation de l'hôte : l'immunodépression chronique, pas plus que le transfert passif d'anticorps spécifiques ou de cellules spléniques immunes n'ont permis de modifier l'évolutivité comparée aux groupes témoins non traités.

II - MECANISME DE LA PERSISTANCE VIRALE

Un certain nombre de mécanismes peuvent être à l'origine de la persistance d'un virus. Nous allons les envisager successivement :

... / ...

1° Il ne s'agit pas, dans notre modèle, d'un état de tolérance immunologique : on sait en effet que ce qui définit la tolérance immunitaire à un antigène donné est l'absence de toute réponse immune, humorale et cellulaire, à cet antigène. Ce mécanisme a pu être démontré avec une autre virose murine, dûe au virus de la lympho-chorio-méningite (LCM). L'état de tolérance peut être induit par contamination pendant la grossesse avec passage transplacentaire du virus (23) : aucune réponse immune n'est décelable, et le virus persiste indéfiniment.

Dans notre modèle, ce mécanisme est totalement exclu, puisque nous avons montré l'existence d'une réponse immune normale au cours de la maladie.

2° Il ne semble pas s'agir non plus d'une inefficacité de la réponse immune. Cette situation a été décrite avec le virus Visna du mouton (25), avec le virus LCM chez la souris (24), infectée en période néonatale avec une dose critique : le virus persiste alors malgré une réponse immune humorale ; dans ce cas, le complexe virus - anticorps reste infectant, et le virus est donc transmissible à partir du sérum des animaux chroniquement infectés. Nous avons vu que ce n'est pas le cas dans notre modèle, ce qui rend l'hypothèse d'une réponse immune inefficace peu vraisemblable.

3° Dans notre modèle, le rôle de la réponse immune paraît très différent pendant la phase "aiguë" et la phase "chronique" de la maladie.

- Pendant la phase "aiguë", c'est-à-dire la première semaine de la maladie, le rôle de la réponse immune est déterminant : dans la lignée DBA/2, l'absence de réponse immune décelable (22) paraît responsable de la sensibilité "aiguë" avec 100 p. cent de décès précoces. Par contre, lorsque ces mêmes souris sont protégées par transfert passif d'anticorps, elles survivent à la phase aiguë de l'hépatite. De même, la lignée C_3H/He échappe spontanément au décès par hépatite précoce en développant rapidement

une réponse immune.

- Au cours de la phase "chronique" au contraire, le rôle de la réponse immune paraît accessoire ou nul. La persistance du virus et l'évolutivité des lésions viscérales paraissent strictement indépendantes de l'état de l'immunisation. Au cours de cette phase, on est donc amené à imaginer une persistance strictement intra-cellulaire du M. H. V. 3 à l'état quiescent, ou "lent".

Ainsi, le M. H. V. 3 se conduirait comme un virus "lent". Par ce terme, nous n'entendons pas signifier que le virus lui-même s'est modifié, au point d'avoir perdu toute capacité de réplication; nous avons vu au coutraire que, lorsqu'il est prélevé du "gite" cellulaire où il persiste à l'état quiescent, et qu'il est réinjecté à des souris sensibles (DBA/2), le M. H. V. 3 présente d'emblée une capacité de réplication normale, entrainant la mort de l'animal dans les délais rapides habituels. C'est donc la relation hôte-virus qui paraît modifiée.

4° Relation hôte-virus. Schématiquement, dans les conditions normales, le parasitisme d'une cellule par un virus peut être de deux types : soit le virus est cytopathogène, et sa réplication est directement responsable de la mort cellulaire, qui entraine la libération des virions et leur destruction par les anticorps et les lymphocytes immuns circulants. Soit le virus n'est pas cytopathogène, mais sa replication se limite progressivement au bout de quelques cycles, cependant que la réponse immune empêche la virémie et la contamination de nouvelles cellules.

Toutefois, on a montré récemment (26) que certains virus pouvaient persister "physiologiquement" au niveau du système réticulo-endothélial. Chez le lapin ayant guéri normalement d'une infection vaccinale, le virus de la vaccine est retrouvé plusieurs mois plus tard, en très faible quantité mais sous forme vivante, au niveau des macrophages de la rate. Cette

... / ...

persistance pourrait être physiologique, permettant une stimulation antigénique prolongée responsable de la mémoire immunologique.

Nous avons vu que, dans notre modèle, un faisceau d'arguments nous amenait à penser que le M. H. V. 3 persiste, en faible quantité, dans le système réticulo-endothélial, donc dans des conditions analogues à la persistance du virus de la vaccine dans les macrophages de lapin. Toutefois, avec le M. H. V. 3, la persistance virale ne paraît pas "physiologique", car elle s'associe constamment à des lésions tissulaires responsables d'une maladie finalement toujours léthale.

Ainsi, notre modèle expérimental pourrait être l'exemple d'une relation macrophage-virus anormale, pathologique, directement responsable des lésions cellulaires.

Ceci nous amène à discuter le mécanisme intime des lésions tissulaires au cours de cette virose persistante.

III - MECANISME DES LESIONS TISSULAIRES AU COURS DE LA VIROSE PERSISTANTE

1° Les lésions tissulaires ne sauraient être le fait d'un défaut de la réponse immune, entraînant une multiplication libre du virus. Nous avons vu au contraire que les titres du virus dans les divers organes restaient constamment très faibles. D'ailleurs l'immunodépression n'aggrave pas l'évolutivité des lésions.

2° Un mécanisme immunopathologique par toxicité de la réponse immune pourrait être envisagé.

Ce mécanisme a été prouvé pour d'autres viroses, en particulier pour la lympho-chorio-méningite de la souris. Les souris adultes infectées par le virus L. C. M. créent leurs lésions tissulaires lors de l'apparition des anticorps. En supprimant la réponse immune par l'irradiation, la chimiothérapie (27) ou le sérum anti-thymocyte (28), le virus persiste mais

... / ...

aucune maladie n'apparait. Ce n'est donc pas la persistance du virus, mais la réponse immune qui est responsable des lésions cellulaires, par un mécanisme toujours discuté.

Toutefois, dans notre modèle, l'immunodépression ne diminue pas l'évolutivité des lésions. De même, la lignée DBA/2 développe la maladie sans qu'aucune réaction immune ne soit décelée. Ce mécanisme immunopathologique n'est donc certainement pas en cause.

3° Il semble que le M. H. V. soit directement cytotoxique.

In vitro, nous avons vu qu'un effet cytopathogène était toujours observé, avec apparition de cellules géantes suivie de nécroses cellulaires.

Par ailleurs, nos observations en microscopie électronique nous ont montré une discordance frappante entre l'importance des nécroses hépatiques et le faible nombre de virions visibles ; d'ailleurs, les titres du virus dans les divers organes sont extrêmement modestes, nous l'avons vu. Ces données ne sont pas compatibles avec une cytotoxicité directe du virus au niveau de très nombreuses cellules d'un même organe.

On est donc amené à imaginer une toxicité indirecte du virus sur les divers tissus de l'organisme, liée à une pathologie du macrophage chroniquement infecté : deux mécanismes intimes seraient alors possibles :

- ou bien le macrophage infecté serait dans un état d'"hyperactivité" tel qu'il deviendrait capable d'agresser, par hyperphagocytose, les tissus environnants ;

- ou bien le macrophage infecté serait capable d'excréter des facteurs solubles, toxiques pour les cellules environnantes. Un certain nombre d'arguments, tirés de la littérature, plaident en faveur de cette dernière hypothèse.

... / ...

4° Rôle possible de facteurs chimiques solubles dans la pathogénie des lésions tissulaires.

a) La responsabilité directe du virus dans les nécroses cellulaires a déjà été mise en doute dans d'autres modèles expérimentaux :

- C'est le cas pour le Reo-virus : il s'agit d'un virus hépato-encéphalitique, parasitant le macrophage mais différent du M. H. V. 3 par sa taille (600 à 700 Å). On a pu montrer que les titres de virus intra-hépatiques sont très faibles, contrastant avec des nécroses hépatocytaires intenses (29, 30, 31).

Par ailleurs, les hépatocytes en voie de dégénérescence ne contiennent pas de Reo-virus (32).

- Surtout, l'analogie de notre modèle expérimental avec la virose persistante de la souris par le virus LDV (lacto-deshydrogenase-virus) est frappante.

Le virus LDV est un virus RNA à replication élective au niveau du système réticulo-endothélial (33, 34, 35, 36).

SNODGRAN, LOWREY et HANNA ont pu montrer récemment (37) que les particules virales sont vues, en microscopie électronique, au niveau de la membrane cellulaire des cellules phagocytantes du réticulum thymique. Ces cellules montrent exceptionnellement des images de dégénérescence. Par contre, les lymphocytes environnants, non replicateurs de virus, sont le siège d'une dégénérescence et d'une nécrose, suivies d'une phagocytose par les macrophages des débris cellulaires. Ces images sont identiques chez les animaux surrénalectomisés. Les auteurs en déduisent que l'effet cytopathique est "medié" par un facteur soluble.

b) Pour le M. H. V. 3, un certain nombre de résultats expérimentaux plaident également en faveur d'une toxicité indirecte, chimique, à l'origine des lésions.

... / ...

Les travaux de VAINIO et JUDAH (38) ont montré un effet protecteur, *in vitro* et *in vivo*, des antihistaminiques sur la nécrose hépatocellulaire, malgré une replication de M. H. V. 3 inchangée.

Or les antihistaminiques sont des protecteurs de la membrane lysozomale, et protègent l'hépatocyte contre tous les agresseurs chimiques du foie (39, 40, 41, 42, 43, 44).

c) Le mécanisme intime des lésions au cours de l'hépatite aiguë par le M. H. V. 3, pourrait être une activation des enzymes lysozomales, selon ALLISON et MALUCCI (45, 46, 47, 48, 49) et DI SIMONE. A un stade très précoce (6ème heure), on observe une élévation des fractions libres des hydrolases acides lisozomales dans le tissu hépatique infecté. Ceci traduit une modification de la perméabilité des membranes lysozomales. Dans un stade ultérieur, ce sont les fractions solubles des mêmes activités enzymatiques qui sont élevées ; ce phénomène indique la destruction des particules lysozomales. Ce n'est qu'après ce processus qu'apparaissent enfin les signes de nécrose hépatocytaire, histologique et enzymatique (élévation des transaminases).

Nous proposons l'hypothèse que ce phénomène de toxicité enzymatique, suraigu au cours de l'hépatite précoce, pourrait se prolonger de façon subaiguë au cours de la virose chronique. Le macrophage chroniquement infecté libèrerait, dans son milieu environnant, un certain nombre de substances lysozomales capables de détruire chimiquement les cellules avec lesquelles elles entrent en contact : au niveau des organes lymphoïdes, ce sont les lymphocytes qui seraient les victimes de cette agression, ce qui pourrait expliquer l'atrophie splénique progressive que nous avons observée. Au niveau du foie, ce sont les hépatocytes qui subiraient l'agression, d'où les aspects histologiques d'hépatite nécrosante persistante. Au niveau du cerveau, c'est le micro-environnement des astrocytes et des cellules gliales qui souffrirait, avec nécrose progressive des neurones.

... / ...

Dans notre modèle, la prédominance de la symptomatologie neurologique pourrait s'expliquer par le caractère irréversible des destructions neuronales. En effet, dans tous les organes, la régénération tissulaire peut compenser les destructions permanentes. Le neurone, au contraire, a perdu toute capacité de reproduction, ce qui expliquerait le caractère cumulatif des désordres tissulaires, et la prédominance encéphalitique des symptômes de la maladie.

Ainsi, une relation hôte-virus pathologique aboutirait, par un mécanisme vraisemblablement chimique, à des lésions viscérales disséminées à prédominance encéphalique.

Ce modèle expérimental nous paraît particulièrement intéressant, car des analogies évidentes peuvent être faites avec un certain nombre de viroses persistantes humaines, dont la pathogénie pourrait être proche. Ainsi la foetopathie persistante du virus des inclusions cytomégaliques donne lieu à des images hyperphagiques des macrophages très caractéristiques. Le virus de l'Herpes simplex de l'homme, parasite connu du système réticulo-endothélia est parfois responsable d'encéphalites gravissimes. La responsabilité du virus de la rougeole est fortement incriminée dans l'encéphalite de Van Bogart, où le virus paraît persister à l'état "lent", malgré une réponse immunologique normale. Dans la leuco-encéphalopathie multifocale progressive, la microscopie électronique a mis en évidence des inclusions virales caractéristiques, exclusivement au niveau des astrocytes du système réticulo-endothélial du cerveau. L'épidémiologie de la maladie de Parkinson, comme celle de la sclérose en plaques, sont compatibles avec l'origine virale de ces maladies. Toutes ces viroses persistantes donnent lieu à des nécroses et des démyélinisations caractéristiques. Ce type de lésion est, nous l'avons vu, tout à fait compatible avec une agression chimique, déclanchée par la persistance anormale d'un virus, dans le cadre d'une relation hôte-virus pathologique.

C O N C L U S I O N

Ce travail nous a permis de décrire un modèle expérimental nouveau : il s'agit d'une virose persistante chez la souris infectée par le virus de l'hépatite murine M. H. V. 3. La persistance virale paraît se faire au niveau du système réticulo-endothélial. Elle donne lieu à une réponse immune normale, à la fois humorale et cellulaire, mais cette immunisation est incapable de débarrasser l'organisme du virus. Une fois installée, la maladie évolue pour son propre compte, et son évolutivité semble indépendante de la qualité et de l'intensité de la réponse immune.

La pathogénie de cette maladie a été discutée. Elle nous paraît être le fait d'une relation virus - macrophage pathologique, responsable à la fois de la persistance prolongée du virus, et d'une agression, peut-être enzymatique, des tissus chroniquement infectés.

B I B L I O G R A P H I E

1. GLEDHILL A. M., DICK G. W. A., NIVEN J. S. F. : Studies on mouse hepatitis virus.
Proc. Sixth Congr. Intern. Microbiol. Rome, 3 : 219, 1953

2. DICK G. W. A., NIVEN J. S. F., GLEDHILL A. W. : A virus related to that causing hepatitis in mice.
Brit. J. Exp. Path., 37 : 90, 1956

3. SVOBODA D., NIELSON A., WERDER A., HIGGINSON J. : An electro microscopic study of viral hepatitis in mice.
Amer. J. Path., 42 : 205, 1962

4. MALLUCI L. : Observation on the growth of mouse hepatitis virus (M.H.V.3) in mouse macrophages.
Virology, 25 : 30, 1965

5. PIAZZA M. : Experimental hepatitis in Mice. 1969

6. MORRIS J. A., AULISIO G. G. : A new member of hepato-encephalitis group of murine viruses.
Fed. Proc. 13 : 506, 1954

7. MORRIS J. A.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100 : 875, 1959

8. GLEDHILL A. W., DICK G. W. A., NIVEN J. S. F. : Studies on mouse hepatitis virus (MHV).
Proc. Sixth Congr. Intern. Rome, 3 : 219, 1953

9. MANAKER R. A., PICZAK C. V., MILLER A. A., STANTON M. F. : A hepatitis virus complicating studies with mouse leukemia.
J. Nat. Cancer Inst. 27 : 29, 1961

10. RUEBNER B. H., BRAMHALL J. L. : Pathology of experimental virus hepatitis in mice.
Arch. Path. 69 : 190, 1960

11. PICCININO F., GALANTI B., GIUSTI G. : Lack of transplacental transmissibility of MHV 3 Virus.
Arch. Ges. Virusforsch. 18 : 327, 1966

12. DE RITIS F., PIAZZA M.

13. PIAZZA M., PANE G., DE RITIS F. : The fate of MHV 3 after intravenous injection into susceptible mice.
Arch. Ges. Virusforsch. 22 : 472, 1967

14. MIYAI K., SLUSSER R., RUEBNER B. H. : Viral hepatitis in mice : an electron microscopic study.
Exp. Molec. Path. 2 : 164, 1963.

15. RUEBNER B. H., HIRANO T., SLUSSER R. J. : Electron microscopy of the hepatocellular and Kupffer cell lesions of mouse hepatitis.
Amer. J. Path., 51 : 163, 1967

... / ...

16. HILLIS W. D., BANG F. B. : Cultivation of embryonic and adult liver cells on a collagen substrate.
Exp. Cell. Res. 17 : 557, 1959

17. HAFF R. F. : Plaque formation by a mouse hepatitis virus.
Virology, 18 : 507, 1962

18. BANG F. B., WARWICK A. :
J. Pathol. Bacteriol. : 73 : 321, 1957

19. BANG F. B., WARWICK A. : Mouse macrophages as host cells for the mouse hepatitis virus, and the genetic basis of their susceptibility.
Proc. N. A. S. 46 : 1065, 1960.

20. KANTOCH M. A., WARWICK A., BANG F. B. : The cellular nature of genetic susceptibility to a virus.
J. Exp. Med. 117 : 781, 1963

21. LAURIA D., VILLARI V., PARIANTE F. : Tentativi di neurotropizzazione del virus MHV 3.
Riv. Ist. Sieroter. Ital. 34 : 473, 1959

22. DUPUY J. M. : Communication personnelle.

23. VOLKERT M., HANNOVER-LARSEN J. : Immunological tolerance to viruses.
Prog. Med. Virol. 7 : 160, 1965

24. VOLKER M., HANNOVER-LARSEN J. : Studies on immunological tolerance to LCM virus.
Acta Path. Microbiol. Scand. 63 : 161, 1965

25. GUDNADOTTIR M., PALSSON P. A. : Host-virus interaction in Visna infected sheep.
J. Immunol. 95 : 116, 1965

26. ALLISON A. C. : Progress in immunology n° 1
Workshop n° 68

27. HOTCHIN J. : The biology of LCM infection : virus-induced immune disease.
Cold. Spp. Harb. Symp. Quant. Biol. N. Y. 27, 1962

28. HIRSCH M. S., MURPHY F. A., RUSSE H. P., HICKLIN M. D. : Effect of anti-Thymocyte serum on LCM infection in mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125 : 980, 1967

29. HARFARD C., HAMLIN A., MIDDLECAMP J. N., BRIGGS D. D. :
J. Lab. clin. Med. 60 : 179, 1962

30. GOMATOS P., TAMM I., DALES S. :
Virology, 17 : 441, 1962

31. RHIM J., SMITH K., MELNICK J. :
Virology, 15 : 428, 1961

32. SVOBODA D., NIELSON A., WERDER A., HIGGINSON J. :
Amer. J. Pathol. 41 : 205, 1962

33. EVANS R., SALAMAN M. H. :
J. Exp. Med. 122 : 993, 1965

... / ...

34. PLAGEMANN P. G. W., SWIM H. F. :
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121 : 1147, 1966

35. ANDERSON C. E., RILEY V., FITZMAURICE M. A., LOVELESS J. D., WADE P., MOORE A. E. :
J. Nat. Cancer Inst. 36 : 89, 1966

36. DUBUY H. G., JOHNSON M. L. :
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128 : 1210, 1968

37. SNODGRASS M. J., LOWREY D. S., HANNA M. G. :
J. Immunol. 108 : 877, 1972

38. VAINIO , JUDAH J. D. :
Exp. Molec. Path. 1 : 15, 1962.

39. GALLAGHER C. H., GOPTA D. N., JUDAH J. D., REES :
J. Pathol. Bacteriol. 72 : 19, 1956

40. JUDAH J. D. :
Nature, 185 : 390, 1960
Exptl. Cell. Res. 19 : 404, 1960
Nature, 187 : 506, 1960

41. JUDAH J. D., McLEAN A. E. M. :
Biochem. Pharmacol. 1962

42. JUDAH J. D.
Biochem. Biophys. Acta, 53 : 325, 1961

43. McLEAN A. E. M. :
Nature, 185 : 191, 1960
Nature, 185 : 936, 1960

44. REES K. R., SINNA K. S., SPECTOR M. :
J. Pathol. Bacteriol. 81 : 107, 1961

45. ALLISON A. C., SANDELIN K. : Activation of lysozomal enzymes in virus infected cells and its possible relationship to cytopathic effect.
J. Exp. Med. 117 : 879, 1963

46. ALLISON A. C., MALLUCCI L. :
J. Exp. Med. 121 : 563, 1965

47. MALLUCCI L., ALLISON A. C. :
J. Exp. Med. 121 : 477, 1965

48. MALLUCCI L. :
Virology, 28 : 355, 1966

49. ALLISON A. C., BURSTONE M. S. :
Histochem. 3 : 462, 1964

Vu, le Président de Thèse :

D. ALAGILLE

Vu, le Doyen de la Faculté :

A. MONSAINGEON

Vu, et permis d'imprimer,

le Recteur de l'Académie,

R. MALLET

Vu, le Président de Thèse :

D. ALAGILLE

Vu, le Doyen de la Faculté :

A. MONSAINGEON

Vu, et permis d'imprimer,

Le Recteur de l'Académie,

R. MALLET